

エタノール処理により HepG2 細胞の培養上清に 出現するコラーゲン産生促進因子の解析

乾 典 明 加 藤 淳 二

札幌医科大学医学部内科学第四講座 (主任 新津洋司郎 教授)

Analysis of Collagen-Stimulating Activity in the Conditioned Medium of Ethanol-Treated HepG2 Cells

Noriaki INUI and Junji KATO

Fourth Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University

(Chief : Prof. Y. NIITSU)

ABSTRACT Alcohol-induced hepatic fibrogenesis occurs in the absence of any obvious hepatocellular inflammation or tissue necrosis. However, the precise mechanism of this fibrosis has not been fully elucidated. We previously found that collagen stimulating activity was detected in the conditioned medium of ethanol-exposed human hepatoblastoma HepG2 cells. The aim of this study is to characterize this factor which facilitates hepatic fibrosis in alcoholic liver disease.

Type I procollagen peptide (PIC) synthesis by human fibroblast IMR-90 markedly increased after incubation with the conditioned medium of ethanol-treated HepG2 cells. The collagen stimulating activity was immuno-absorbed with anti-transforming growth factor (TGF)- α antibodies in a dose-dependent manner. TGF- α in the conditioned medium of ethanol-treated HepG2 and serum TGF- α levels in patients with alcoholic liver disease were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay. TGF- α in the conditioned medium of ethanol-treated HepG2 was significantly increased. Serum TGF- α levels in patients with liver fibrosis in alcoholic liver disease were significantly higher than those in chronic viral hepatitis and viral cirrhosis.

In conclusion, TGF- α is one of the causative factors for the development of hepatic fibrosis in alcoholic liver disease.

(Received August 19, 1997 and accepted September 8, 1997)

Key words: Ethanol, Alcoholic liver fibrosis, Procollagen peptide, HepG2 cells

1 緒 言

肝線維化は、通常、アルコール、肝炎ウイルス感染、遺伝的な金属代謝異常などを原因とする慢性肝疾患に伴って生じる¹⁻⁴⁾。肝線維化の成立には、肝でのコラーゲン産生細胞である lipocyte (星細胞、伊東細胞、筋線維芽細胞または fat-storing cell と呼ばれる)の活

性化およびコラーゲン合成増加が必須の過程であり、それには lipocyte 活性化因子の存在が必要であると考えられている^{1,5)}。ウイルス性肝硬変や、Wilson 病・ヘモクロマトーシスで生ずる肝線維化において作動する lipocyte 活性化因子は、肝組織の炎症や細胞壊死に伴って活性化した Kupffer 細胞、リンパ球あるいは血小板から放出される transforming growth factor- β

Abbreviations:

TGF : transforming growth factor
TNF : tumor necrosis factor
PDGF : platelet-derived growth factor
DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

PBS : phosphate-buffered saline
PIC : type I procollagen peptide C
IGF : insulin-like growth factor

(TGF- β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) および platelet-derived growth factor (PDGF) であることが明らかにされている⁶⁻⁹⁾。一方、アルコール性肝疾患に伴う肝線維化では、多くの場合、組織の炎症、細胞壊死や炎症細胞浸潤を伴わずに perisinusoidal あるいは pericellular に線維化が出現することが特徴とされている^{10,11)}。つまりアルコールによる肝線維化誘導には、炎症以外の機転が働いているものと推定される。これまで、アルコールやその代謝産物が直接 lipocyte のコラーゲン合成に影響を与える可能性は、多数検討されてきた。しかし、アセトアルデヒドや乳酸が、lipocyte のコラーゲン合成を直接刺激すること^{12,13)}が報告される一方で lipocyte のコラーゲン合成に全く影響しないという相反する報告^{14,15)}もなされており、アルコール性肝線維化の成立機序は未だ明確でない。

最近、われわれは、エタノール代謝能¹⁶⁾およびアルブミン合成能¹⁷⁾といった正常の肝細胞に準じた機能を有するヒト肝芽腫由来 HepG2 細胞をエタノール存在下に培養すると、その培養上清中に線維芽細胞のコラーゲン合成を促進する分子量約 6,000-8,000 ダルトンのポリペプチド因子が出現することを見出した¹⁸⁾。この研究結果から、本因子がエタノールに暴露された肝細胞から分泌される lipocyte 活性化因子である可能性が想定される。

そこで本研究では、上述のポリペプチド因子の同定を試みるとともに、それがアルコール性肝線維化における肝細胞由来の lipocyte 活性化因子である可能性について検討した。

2 方 法

2.1 培養細胞株

ヒト肝芽腫由来細胞株 HepG2¹⁷⁾ は、米国コネチカット州立大学 Wu 博士より供与を受けた。ヒト線維芽細胞由来 IMR-90¹⁹⁾ は、大日本製薬から購入した。いずれの細胞も 10% 牛胎仔血清 (FBS) 添加 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 培養液中で 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。

2.2 HepG2 細胞のエタノール処理

HepG2 細胞のエタノール処理は既報¹⁸⁾に準じて行なった。すなわち、HepG2 細胞を 10%FBS を含む DMEM 培地でエタノール存在下 (50 および 100 mM) または非存在下に 14 日間培養した。なお、培養液は 2 日毎に交換した。その後、細胞を phosphate-buffered saline (PBS) で 3 回洗浄し、トリプシン処理により培養フラスコから剝離・洗浄後、5×10⁵ 個の細胞を 12 穴

のカルチャープレートに蒔き、2 ml の DMEM 培養液中で 18 時間培養した。培養上清を回収し、300 g、10 分間遠心して cell debris を除去した。その後、培養上清中のエタノール、アセトアルデヒド、乳酸などの低分子物質を除去する目的で 37°C の恒温槽で 1 時間インキュベーションした後、分子量カットオフ 1,000 の限外濾過膜 (Spectra/Por® membrane) を用い PBS で透析した。

2.3 コラーゲン産生促進活性の測定

コラーゲン産生促進活性は、IMR-90 細胞からの type I procollagen peptide C (PIC) の産生量で評価した。10⁵ 個の IMR-90 細胞を 12 穴のカルチャープレートに蒔き、10%FBS を含む DMEM 培養液中で 18 時間培養した。次に、細胞を PBS で 3 回洗浄後、DMEM と 2:2 で調整した HepG2 細胞培養上清を 1:1 の割合で混合した 2 ml の培養液で 18 時間培養した。その後、IMR-90 細胞の培養上清を回収し、その PIC 濃度を ELISA キット (宝酒造) を用いて比色定量した。測定は全て triplicate で行ない、平均値を測定値とした。

2.4 培養上清の各種サイトカイン抗体処理

既に報告¹⁸⁾したように、HepG2 細胞由来のコラーゲン産生促進活性の分子量は約 6,000-8,000 ダルトンであったことから、それに分子量が近似する既知のサイトカインに対する抗体を用いて活性吸収試験を行った。使用した抗体は、Austral Biological 社より購入した抗インスリン抗体、抗 insulin-like growth factor (IGF)-I 抗体および抗 IGF-II 抗体、R&D 社製の抗 PDGF 抗体、抗 TNF- α 抗体、抗 epidermal growth factor 抗体、抗 TGF- β 抗体および抗 interleukin-1 β 抗体、Chemicon 社製の抗 TGF- α 抗体である。2:2 で調整した HepG2 細胞培養上清 1 ml に 0.1, 1, 10 および 100 μ g/ml の濃度で各抗体を添加し、4°C、4 時間インキュベーションした後、20 μ l の Protein G Sepharose beads (Pharmacia) を加え、さらに 4°C、1 時間インキュベーションした。遠心後に得られた上清のコラーゲン産生促進活性を 2.3 の方法により測定した。

2.5 TGF- α 濃度の測定

2.5.1 HepG2 培養上清中の TGF- α 濃度

2.2 で得られた HepG2 細胞の培養上清中の TGF- α 濃度を TGF- α ELISA キット (大塚アッセイ) を用いて比色定量した。

2.5.2 アルコール性肝疾患患者の血清中 TGF- α 濃度

対象として、文部省科学研究費補助金総合研究 (A) 班 (班長: 高田 昭) の診断基準試案²⁰⁾に従いアルコー

ル性肝疾患と診断した、当科または関連病院に入院した男性 20 名および女性 4 名 (平均年齢 48 ± 15 歳) の入院時血清を用いた。これらの全ての患者は HBs 抗原・抗体, HBc 抗体, 第 2 世代 HCV 抗体が陰性であった。経皮的肝生検は入院後 7 日以内に施行した。また、対照として飲酒歴のない慢性肝炎症例 10 名 (B 型 5 名, C 型 5 名; 平均年齢 42 ± 12 歳) と 6 名の肝硬変症例 (B 型 3 名, C 型 3 名; 平均年齢 63 ± 8 歳) および 8 名の健常人 (平均年齢 40 ± 8 歳) の血清を用いた。血清 TGF- α 濃度は $2.5 \cdot 1$ に従い測定した。測定は全て triplicate で行ない、平均値を測定値とした。

2.6 統計処理

測定値は、平均値 \pm 標準偏差として表した。統計学的有意差の検定は、paired または unpaired Student's *t*-test を用い、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

3 結 果

3.1 エタノール処理 HepG2 細胞培養上清中のコラーゲン産生促進活性

エタノール存在下または非存在下に 14 日間培養した HepG2 細胞の viability は trypan blue dye exclusion 法で両者とも 95% 以上であり、増殖曲線に差異は認められなかった (Fig. 1)。さらに DMEM 液で 18 時間培養した HepG2 細胞の上清中の PIC はエタノール処理、非処理に拘わらず検出感度以下 (10 ng/ml 以下) であった。また、その間の細胞数は共に約 20% 増加したが両群間に有意差は見られなかった (Fig. 2)。

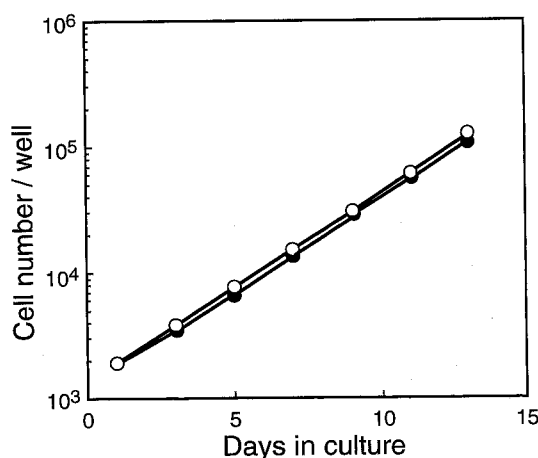


Fig. 1 Cell growth curves of HepG2 cells. The cells were cultured in the presence (●) or absence (○) of 100 mM ethanol for 14 days.

エタノール非処理または処理した HepG2 細胞の培養上清を添加し 18 時間培養した IMR-90 細胞の上清中 PIC 濃度は、エタノール非処理群で $0.47 \pm 0.0 \mu\text{g/ml}$ に増加し、エタノール処理群では $1.19 \pm 0.1 \mu\text{g/ml}$ とさらに増加した。また、その間の細胞数はエタノール非処理群で 1.3 倍、エタノール処理群で 1.7 倍に増加し、前者に比べ後者で有意に ($P < 0.001$) 増加していた (Fig. 3)。

3.2 各種サイトカイン抗体処理によるコラーゲン産生促進活性の変化

100 mM エタノール存在下に 18 時間培養した HepG2 細胞の培養上清中のコラーゲン産生促進活性を $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度の各種サイトカインに対する抗体で吸収した結果、抗 TGF- α 抗体で処理した時のみ有意に低下した (data not shown)。Fig. 4 に示したように抗 TGF- α 抗体の濃度依存性に HepG2 細胞培養上清中のコラーゲン産生促進活性は低下し、その最も低いレベルは HepG2 細胞の培養上清を添加していないレベルと同等であり (Fig. 3)、その最大吸収率はほぼ 100% であると推定された。これらの結果から、本コラーゲン産生促進活性は TGF- α であると考えられた。

3.3 HepG2 細胞培養上清中の TGF- α 濃度測定

HepG2 細胞の培養上清中の TGF- α 濃度を ELISA 法で測定した結果を Fig. 5 に示した。エタノール非添

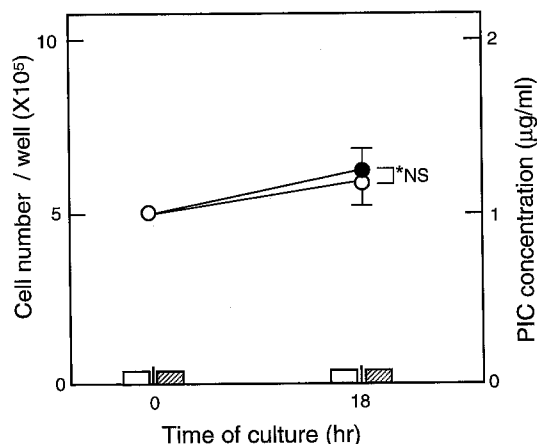


Fig. 2 Cell proliferation and secretion of PIC in the conditioned medium of HepG2. Ethanol-treated (●) or non-treated (○) HepG2 cells were cultured in FBS-free DMEM for 18 hours. The columns represent PIC concentration in the conditioned medium of cells by treatment with (hatched) or without (□) ethanol. *NS: not significant.

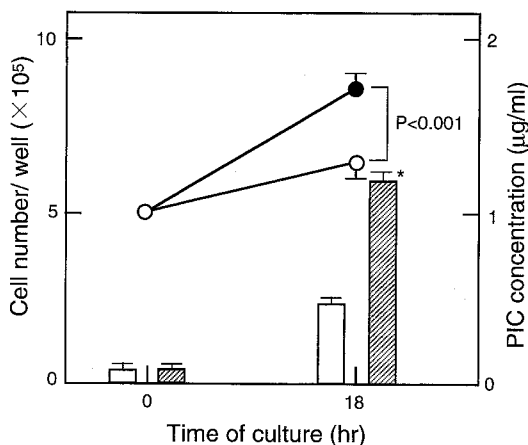


Fig. 3 Effect of the conditioned medium of ethanol-treated HepG2 cells on the cell growth (circles) and secretion of PIC (squares) in IMR-90 cells. The cells were cultured in the presence (●, ■) or absence (○, □) of the HepG2 conditioned medium for 18 hours.

* $P < 0.05$ vs the value of white column at 18 hr.

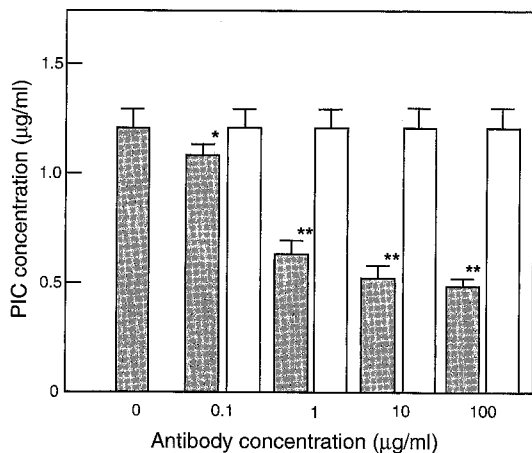


Fig. 4 Immunoabsorption of collagen stimulating activity in the conditioned medium of HepG2 cells by treatment with anti-TGF- α antibodies (■) or normal rabbit IgG (□).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs the value in the absence of antibodies.

加の条件で培養した HepG2 細胞を新鮮 DMEM 液で 18 時間培養した場合、上清中の TGF- α 濃度は検出感度以下 (20 pg/ml 以下) から $229.4 \pm 13 \text{ pg/ml}$ に増加した。さらに、 100 mM エタノールの存在下で培養した

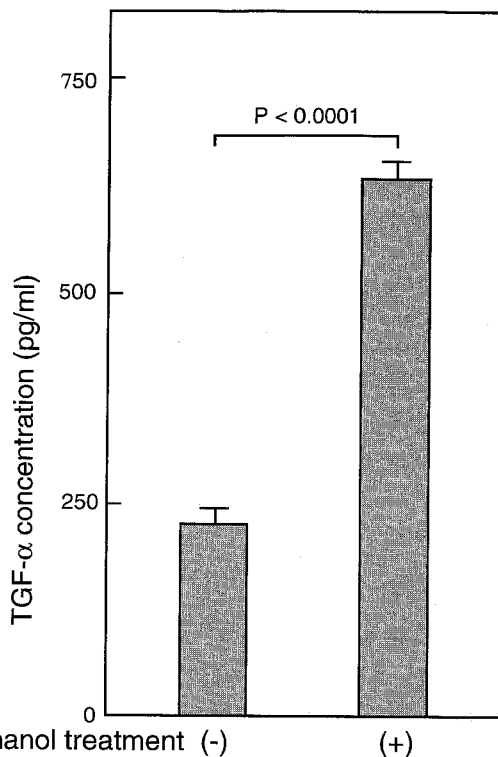


Fig. 5 Detection of TGF- α in the conditioned medium of HepG2 cells. HepG2 cells were cultured in FBS-free DMEM in the presence or absence of ethanol for 18 hours. TGF- α concentration in the conditioned medium was determined by ELISA as described in Materials and Methods.

HepG2 細胞では、18 時間後の上清中の TGF- α 濃度はエタノール非添加時の約 3 倍 ($635.8 \pm 13 \text{ pg/ml}$) に増加した。すなわち、HepG2 細胞は TGF- α を産生すること、さらにエタノール存在下に培養すると、その産生量が有意に増加することが示唆された。

3・4 各種肝疾患患者血清中の TGF- α 濃度

Table 1 に各種肝疾患患者の血清 TGF- α 濃度を測定した結果を示した。健康人の血清 TGF- α 濃度 $325 \pm 153 \text{ pg/ml}$ に比べ、脂肪肝以外のアルコール性肝疾患ではいずれも有意に高値を示した。中でもアルコール性肝硬変およびアルコール性肝線維症の血清 TGF- α 濃度は健康人の値と比べ 3 倍以上の増加を示した。また、アルコール性肝線維症及び肝硬変における血清 TGF- α 濃度はウイルス性肝硬変に比べて有意に高値を示した。一方、ウイルス性肝炎・肝硬変における血清 TGF- α 濃

Table 1 Measurement of serum TGF- α levels in patients with alcoholic liver diseases, viral hepatitis and cirrhosis, and normal subjects.

	serum TGF- α level (pg/ml)
Normal subjects (n=8)	325 \pm 153
Viral hepatitis (n=10)	427 \pm 257
Viral cirrhosis (n=6)	578 \pm 286
Alcoholic fatty liver (n=5)	486 \pm 100
Alcoholic hepatitis with liver fibrosis (n=6)	828 \pm 143*
Alcoholic liver fibrosis (n=5)	982 \pm 175*,†
Alcoholic liver cirrhosis (n=8)	1,036 \pm 172**,*†

*P<0.005 vs normal subjects

**P<0.001 vs normal subjects

†P<0.05 vs viral cirrhosis

度は、健康人に較べて若干の増加傾向を示したが、両者間には統計学的有意差は認められなかった。

4 考 察

本研究では、エタノールに暴露された HepG2 細胞の TGF- α 分泌量が有意に増加し、それが IMR-90 細胞のコラーゲン産生を刺激することを明らかにした。さらに、臨床的にアルコール性肝疾患において肝線維症および肝硬変患者の血清 TGF- α が有意に高値を示したことから、アルコール性肝線維化の成因として肝細胞由来の TGF- α が lipocyte 活性化因子として関与する可能性が示唆された。

TGF- α は、肝細胞で産生されるサイトカインであり、とくに部分肝切除後の肝再生組織でその発現が著明に増加することから肝細胞の mitogen の一つとして捉えられてきた^{21,22)}。また、肝細胞癌患者の血清 TGF- α 濃度は上昇することが報告されており、TGF- α は肝癌細胞の autocrine 増殖因子として作用することも想定されているが²³⁾、その他の肝疾患における TGF- α の意義は明らかでない。TGF- α の作用は、細胞表面の EGF 受容体に結合することにより発揮されるが²⁴⁾、肝組織中には EGF 受容体を有する細胞として肝細胞の他に、lipocyte, Kupffer 細胞、線維芽細胞があり^{25,26)}、それらの細胞に対する影響は不明である。最近、Fang *et al.*²⁷⁾ はアルコール性肝炎において肝細胞の TGF- α 発現が著明に増加することを免疫組織化学的に示し、TGF- α の発現がエタノールによる肝細胞傷害に反応して増加し肝再生因子として作用する可能性を報告しているが、TGF- α と肝線維化との関係については一切言及していない。

本研究では、エタノールあるいはその代謝産物に暴露された肝細胞が lipocyte 活性化因子を産生するという作業仮説のもとに、エタノール代謝能を有する HepG2 細胞を正常肝細胞のモデルと見立て、それをエタノール存在下に培養した時に上清中に分泌される lipocyte 活性化因子を同定しようと試みた。コラーゲン産生促進活性は、ヒト線維芽細胞における I 型コラーゲン由来の PIC を指標としたが、その理由は、Niitsu *et al.*²⁸⁾ および Lippi *et al.*²⁹⁾ が報告しているように PIC が臨床的にアルコール性肝線維化を反映する良い指標であると考えられることによる。

HepG2 細胞をエタノール存在下に培養すると、その上清中に TGF- α 濃度が有意に増加することを示したが (Fig. 5)、その機序が TGF- α 蛋白の合成亢進によるか、あるいは TGF- α は一旦膜結合型として合成されるため³⁰⁾ 細胞膜からの遊離・分泌が促進されるためかは、現段階では不明であり、今後の検討課題である。ところで、HepG2 細胞より分泌された TGF- α は、同細胞に対して autocrine に働き自己の増殖に対して促進的に作用する可能性が想定される。今回の検討では、エタノール存在下に培養した HepG2 の細胞数は非存在下の細胞数に比べ変化がなく (Fig. 1)、このことはエタノールが HepG2 細胞の TGF- α による autocrine 増殖作用に対して相殺的に作用した結果である可能性も考えられた。また、TGF- α は 18 時間の作用で IMR-90 細胞のコラーゲン合成を対照の約 2 倍に増加させたが、細胞数の増加は 1.3 倍に過ぎなかった (Fig. 3)。つまりこのことから、TGF- α は IMR-90 細胞の増殖促進のみならずコラーゲン合成を積極的に亢進させる作用を併せ持つ可能性が推定された。

臨床検体を用いた検討において、アルコール性肝疾患、とくに肝線維症や肝硬変症例の血清 TGF- α 濃度がウイルス性肝硬変に比べ有意に高値を示したことは、実際に *in vivo* においても、エタノールに暴露された肝細胞から TGF- α 産生が亢進し、それが lipocyte 活性化因子として作用しコラーゲン産生を亢進させるという機序が働いている可能性を示唆するものである。今後、更にヒトの lipocyte に対する TGF- α の作用を、より明確にする必要があると思われるが、本研究の結果から、アルコール性肝線維化の成因として、エタノールによって誘導される肝細胞由来の TGF- α が関与するという新たな機序が存在することが示唆された。

5 要 約

エタノールに暴露された HepG2 細胞から分泌されるコラーゲン産生促進因子の同定を試み、それがアルコール性肝線維化における肝細胞由来の lipocyte 活性化因子である可能性を検討し、以下の結果を得た。

1) エタノール存在下に HepG2 細胞を培養すると培養上清中に IMR-90 細胞のコラーゲン合成を促進する因子が増加することを見出した。

2) 上述の因子が、TGF- α であることを明らかにした。

3) アルコール性肝線維症・肝硬変患者の血清 TGF- α が有意に増加することを見出した。

これらのことから、TGF- α がアルコールによる肝線維化形成における肝細胞由来の lipocyte 活性化因子である可能性が強く示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った本学内科学第4講座、新津洋司郎教授に深謝致します。また研究に際し貴重な御助言をいただいた旭川医科大学内科学第3講座、高後 裕教授、および御協力いただいた教室員各位に深謝いたします。

参 考 文 献

- Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993, 328: 1828-1835.
- MacSween RNM, Burt AD. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1986, 6: 221-232.
- Sternlieb I. Copper and the liver. *Gastroenterology* 1980, 78: 1615-1628.
- Niederau C, Fischer R, Sonnenberg A, Stremmel W, Trampisch HJ, Strohmeyer G. Survival and causes of death in cirrhotic and in noncirrhotic patients with primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 1985, 313: 1256-1262.
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: The principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, 82: 8681-8685.
- Friedman SL, Arthur MJP. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. *J Clin Invest* 1989, 84: 1780-1785.
- Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor β : Implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 1990, 11: 599-605.
- Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest* 1989, 84: 1786-1793.
- Peterson TC, Isbrucker RA. Fibroproliferation in liver disease: Role of monocyte factors. *Hepatology* 1992, 15: 191-197.
- Popper H, Lieber CS. Histogenesis of alcoholic fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Am J Pathol* 1980, 98: 695-716.
- Nakano M, Worner TM, Lieber CS. Perivascular fibrosis in alcoholic liver injury: Ultrastructure and histologic progression. *Gastroenterology* 1982, 83: 777-785.
- Savolainen ER, Leo MA, Timpl R, Lieber CS. Acetaldehyde and lactate stimulate collagen synthesis of cultured baboon liver myofibroblasts. *Gastroenterology* 1984, 87: 777-787.
- Moshage H, Casini A, Lieber CS. Acetaldehyde selectively stimulates collagen production in cultured rat liver fat-storing cells but not in hepatocytes. *Hepatology* 1990, 12: 511-518.
- Shiratori Y, Ichida T, Kawase T, Wisse E. Effect of acetaldehyde on collagen synthesis by fat-storing cells isolated from rats treated with carbon tetrachloride. *Liver* 1986, 6: 246-251.
- Tsutsumi M, Takada A, Takase S, Shimanaka K, Enyama K. Effect of ethanol and its metabolites on collagen synthesis by cultured rat liver cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1989, 4: 229-240.
- Kohgo Y, Mogi Y, Kato J, Nakaya R, Nakajima M, Katsuki S, Niitsu Y. Ethanol

- inhibits asialoglycoprotein receptor synthesis but augments its mRNA expression in a human hepatoma cell line. *J Gastroenterol* 1994, 29: 598-604.
17. Knowles BB, How CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980, 209: 497-499.
 18. Inui N, Kato J, Kohgo Y, Katsuki S, Niitsu Y. Detection of activity in the conditioned medium of ethanol-treated HepG2 cells which stimulates collagen synthesis in IMR-90 cells. *Alcohol Clin Exp Res* 1996, 20: 63A-65A.
 19. Nichols WW, Murphy DG, Christofalo VJ, Toji LH, Greene AE, Dwight SA. Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. *Science* 1977, 196: 60-63.
 20. Takada A, Galambos JT. Proceedings of the International Conference on diagnosis of alcoholic liver disease. *Gastroenterol Jpn* 1990, 25: 2-53.
 21. Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factor $\beta 1$ and in chronic liver disease. *N Engl J Med* 1991, 324: 933-940.
 22. Masuhara M, Yasunaga M, Tanigawa K, Tamura F, Yamashita S, Sakaida I, Okita K. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor α , and transforming growth factor $\beta 1$ messenger RNA in various human liver diseases and correlation with hepatocyte proliferation. *Hepatology* 1996, 24: 323-329.
 23. Tomiya T, Fujiwara K. Serum transforming growth factor α level as a marker of hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis. *Cancer* 1996, 77: 1056-1060.
 24. Gruppuso PA. Expression of hepatic transforming growth factor receptors during late gestation in the fetal rat. *Endocrinology* 1989, 125: 3037-3043.
 25. Meyer DH, Bachem MG, Gressner AM. Bidirectional effects of Kupffer cells on hepatocyte proliferation in vitro. *FEBS Lett* 1991, 283: 150-154.
 26. Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995, 22: 28-36.
 27. Fang JWS, Bird GLA, Nakamura T, Davis GL, Lau JYN. Hepatocyte proliferation as an indicator of outcome in acute alcoholic hepatitis. *Lancet* 1994, 343: 820-823.
 28. Niitsu Y, Koda K, Ito N, Owada M, Morita K, Watanabe N, Kohgo Y, Seifter S, Urushizaki I. Measurement of carboxy terminal peptide of type I procollagen in sera of patients with viral hepatitis and liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1988, 3: 159-167.
 29. Lippi G, Fedi S, Grassi M, Rosi E, Liotta AA, Fontanelli A, Cellai AP, Mazzanti R. Acute phase proteins in alcoholics with or without liver injury. *Ital J Gastroenterol* 1992, 24: 383-385.
 30. Wong ST, Winchell LF, McCune BK, Shelton EH, Texido J, Massague J, Herman B, Lee DC. The TGF- α precursor expressed on the cell surface binds to the EGF receptor on adjacent cells, leading to signal transduction. *Cell* 1989, 56: 495-506.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第4講座 乾 典明